"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ООО "Спектр-М"



_____В.В. Додонов

МЕТОДИКА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПРОБ ПОЧВ, ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ И ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД ЭКСПРЕСС - МЕТОДОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРИБОРА СЕРИИ «БИОТЕСТЕР»

ФР.1.39.2015.19243

(взамен ФР.1.31.2005.01882(ред. 2010 г.)

gost.e-ecolog.ru

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПРОБ ПОЧВ, ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ И ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД ЭКСПРЕСС - МЕТОДОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРИБОРА СЕРИИ «БИОТЕСТЕР»

ПНД Ф Т 16.2:2.2-98 (ред.2015г.)

2015

Право тиражирования и реализации принадлежит разработчику.

Настоящее издание методики введено взамен предыдущего издания 2010 г. и действует до выхода нового издания.

Разработчик: ООО "Спектр-М"
Адрес: 191167, г. Санкт-Петербург, а/я 86

т/факс (812) 232-39-42
E-mail – gost.e-ecolog.ru

СОДЕРЖАНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 5
1. ПРИНЦИП МЕТОДА 5
2. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ 6
3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ 7
4. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ 8
5. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ 9
6. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ 9
7. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЯ 9
8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА 11
9. ОБРАБОТКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 13
10. ОЦЕНКА ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ 13
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) 15
ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-ОБЪЕКТА 15
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (обязательное) 16
ВЫРАЩИВАНИЕ КУЛЬТУРЫ 16
ПРИЛОЖЕНИЕ В (обязательное) 18
ПОДГОТОВКА ИНФУЗОРИЙ К АНАЛИЗУ 18
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное) 20
ФОРМА ПРОТОКОЛА БИОТЕСТИРОВАНИЯ 20

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий документ устанавливает методику определения токсичности водных вытяжек из почвы, донных отложений, осадков сточных вод с использованием в качестве тест-объекта инфузорий — *Paramecium caudatum* (в дальнейшем инфузории).

Параметры поведенческой реакции инфузорий определяются с помощью приборов серии "Биотестер" (Биотестер, Биотестер-2, Биотестер-2м, Биотестер-С и др.)

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

1.1. Метод определения токсичности основан на способности тест-объекта реагировать на присутствие в водных вытяжках из почвы, донных отложений и осадков сточных вод веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций (в направлении изменения концентрации) этих веществ (хемотаксическая реакция), избегая их вредного воздействия.

Хемотаксическая реакция реализуется при условии наличия стабильного во времени градиента концентраций химических веществ. Подобный градиент создается путем наслоения в вертикальной кювете (пробирке) на взвесь инфузорий в загустителе испытуемой жидкости (см. п. 8.1). При этом в измерительной кювете образуется стабильная граница раздела, сохраняемая в течение всего времени биотестирования. Эта граница не препятствует свободному перемещению инфузорий в предпочтительном для них направлении и при этом предотвращает перемешивание жидкостей из нижней и верхней зон. После создания в кювете двух зон в течение 30 минут происходит перераспределение инфузорий по зонам. Важная особенность поведенческой реакции инфузорий — массовое перемещение организмов в верхние слои жидкости. В случае, если анализируемая проба не содержит токсических веществ, в кювете будет наблюдаться концентрирование клеток инфузорий в верхней зоне. Наличие в анализируемой пробе токсических веществ приводит к иному характеру перераспределения инфузорий в кювете, а именно: чем выше токсичность пробы, тем меньшая доля инфузорий перемещается в верхнюю зону (анализируемую пробу).

1.2. Критерием токсического действия является значимое различие в числе клеток инфузорий, наблюдаемых в верхней зоне кюветы в пробе, не содержащей токсических веществ - (контроль), по сравнению с этим показателем, наблюдаемым в анализируемой пробе — (опыт).

1.3. Количественная оценка параметра тест-реакции, характеризующего токсическое действие, производится путем расчета соотношения числа клеток инфузорий, наблюдаемых в контрольной и анализируемой пробах

(согласно п. 9.1), и выражается в виде безразмерной величины — индекса токсичности (Т).

2. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ

2.1. Методика обеспечивает получение результатов с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности

Наименование объекта	Показатель повторяемости (среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_r	Показатель воспроизводимости (среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R	Показатель точности (границы абсолютной погрешности при доверительной вероятности P = 0, 95), δ
Почва, донные отложения, осадки сточных вод	0,13 Т	0,30 Т	0,60 Т

Т – результат определения (измерения) токсичности пробы в условных единицах (индекс токсичности).

2.2. За результат токсикологического анализа (Т) принимают среднее арифметическое значение результатов 3-х параллельных определений, расхождение между которыми не превосходит значений норматива оперативного контроля повторяемости (r), приведенных в таблице 2.

2.3. Расхождения между результатами токсикологического анализа, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости (R). При выполнении этого условия приемлемы оба результата, и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение. Значения предела воспроизводимости (R) приведены в таблице 2.

При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости согласно раздела 5 ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002.

Таблица 2

Значения предела повторяемости, воспроизводимости, критической разности при доверительной вероятности P=0,95

Предел повторяемости (допускаемые расхождения для трех результатов параллельных определений), r	Критическая разность (допускаемые расхождения для шести результатов параллельных определений), $CR_{0,95}$ (6)	Предел воспроизводимости (допускаемые расхождения для двух результатов измерений, полученные в разных лабораториях), R
0,43 T	0,52 T	0,83 T

2.4. Качество тест-культуры определяется следующими показателями:

— порог чувствительности к модельному токсиканту ($CuSO_4 \times 5H_2O$) — 0,01 мг/дм^3;

— диапазон реагирования на модельный токсикант находится в пределах 0,01-1,0 мг/дм^3.

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ

— прибор серии «Биотестер», например, Биотестер-2м (№46149-10 в Государственном реестре средств измерений);

— весы лабораторные II класса точности, предел взвешивания 100г, дискретность отсчета 1 мг по ГОСТ Р 53228;

— весы лабораторные IIII класса точности, предел взвешивания 1200г, дискретность отсчета 1г по ГОСТ Р 53228;

— микроскоп бинокулярный с увеличением 10÷50;

— термометр жидкостный стеклянный 0-50°С с ценой деления шкалы 1°С по ГОСТ 28498;

— часы сигнальные;

— пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 см^3 тип 3 по ГОСТ 29228;

— колбы мерные 2-25-2; 2-50-2; 2-100-2; 2-500-2; 2-1000-2 по ГОСТ 1770;

— цилиндры 3-100-2, 3-250-2 по ГОСТ 1770;

— аппарат для встряхивания жидкости в лабораторной посуде АВУ-1 ТУ 64-1-1081;

— баня водяная объемом воды от 1 л, точность установки температуры 5°С, температуры воды от 80°С;

— ступка 6, пестик 3 по ГОСТ 9147;

— холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры

(8 ± 4)°С;

- мельница шаровая лабораторная барабанная МШЛ-1П(С) по ТУ 4846-042-11114244-2010;
- шпатели металлические по ГОСТ 19126;
- посуда для культивирования из химически инертного материала, например, химические стаканы, стаканчики для взвешивания, конические широкогорлые колбы, чашки Петри по ГОСТ 25336;
- лабораторные стаканы Н-2-100; В-2-100 по ГОСТ 25336;
- банки широкогорлые из стекла с притертыми или винтовыми пробками вместимостью 500-1000 $см^3$ для отбора и хранения проб;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;
- натрий хлористый по ГОСТ 4233;
- калий хлористый по ГОСТ 4234;
- кальций хлористый 2-водный;
- магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523;
- натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201;
- медь сернокислая (II) 5-водная по ГОСТ 4165;
- поливиниловый спирт ПВС — марка 11/2, высший сорт по ГОСТ 10779;
- фильтры бумажные обеззоленные (красная, белая ленты) по ТУ 6-09-1678;
- дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ 54731.

Все используемые реактивы должны быть марки х.ч. или ч.д.а.

Возможно применение иных средств измерения, вспомогательного оборудования, технических средств, посуды, и реактивов с характеристиками не хуже, чем у вышеуказанных.

4. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

4.1. Требования электробезопасности при работе с электроустановками соответствуют ГОСТ 12.1.019.

4.2. Специалисты, выполняющие анализы, должны пройти обучение безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

4.3. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.4. Специальных мер по охране окружающей среды при использовании приборов серии «Биотестер» не требуется, так как составляющие не содержат ртути и других материалов, опасных для человека и окружающей среды при хранении, транспортировке и использовании прибора. Инфузории-туфельки не имеют форм, опасных для человека и окружающей среды.

4.5. При работе с химическими веществами соблюдают требования безопасности по ГОСТ 12.1.007 и методические рекомендации ПНД Ф 12.13.1.

4.6. При пробоподготовке загрязненных грунтов, почв, осадков сточных вод пользуются средствами индивидуальной защиты по ГОСТ 12.4.016, ГОСТ 12.4.020.

5. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

Определение токсичности по настоящей методике выполняет лаборант со средним профессиональным образованием, имеющий опыт работы не менее 1 года в химико-аналитической, биологической или близкой по профилю лаборатории.

6. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.
Измерения проводят в следующих условиях:

Температура окружающего воздуха	(+ 15 ÷ +28)°С;
Относительная влажность воздуха	не более 80% (при 25°С);
Атмосферное давление	(84 - 106,7)кПа (630 - 800)мм рт.ст.;
Напряжение питающей сети	(220 ± 22) В;
Частота питающей сети	(50 ± 1)Гц.

7. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЯ

7.1. Отбор и хранение проб

Общие процедуры отбора проб определены в следующих документах:

ГОСТ 17.4.3.01-83 "Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб"

ГОСТ 17.4.4.02-84 "Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа"

ГОСТ 17.1.5.01-80 "Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность"

ПНД Ф 12.1:2:2.2:2.3:3.2-03 "Отбор проб почв, грунтов, донных отложений, илов, осадков сточных вод, шламов промышленных сточных вод, отходов производства и потребления"

Пробы почв, донных отложений, осадков сточных вод, поступившие в лабораторию на исследование, должны быть документально оформлены и маркированы. Сопроводительными документами являются описание проб, даты и времени отбора. Маркировка проб осуществляется в произвольной форме, но с обязательным занесением обозначений в лабораторный журнал.

Хранить пробу можно в холодильнике при температуре (8±4)°С не более одной недели в банке с притертой или плотно завинченной крышкой.

7.2.Подготовка пробы

Донные отложения, почвы, осадки массой не менее 1 кг помещают в чистую сухую посуду, высушивают до воздушно-сухого состояния, разрыхляют и перемешивают металлическим шпателем. Выбирают произвольными порциями, но не более 100 г каждая с промежуточным перемешиванием, массу не менее 0,5 кг, помещают в фарфоровую ступку и размельчают вручную до размеров фракций не более 10 мм. Измельчение пробы в ступке допускается удобными для оператора порциями. Неизмельчаемые фракции более 10 мм удаляют, оставшуюся часть пробы перемешивают и измельчают в шаровой мельнице (100 об/мин 10 мин).

Берут навеску измельченной пробы не менее 30 г (на весах II класса точности) и на 1 часть добавляют 4 части дистиллированной воды. Экстрагирование ведут в течение 2-х часов на аппарате для встряхивания жидкости. После 30-минутного отстаивания надосадочная жидкость фильтруется через бумажный фильтр (красная лента).

Далее к 9 $см^3$ полученного экстракта добавляют 1 $см^3$ концентрата среды Лозина-Лозинского по п. 7.3. Полученную жидкость используют для проведения анализа.

7.3. Приготовление взвеси клеток инфузорий и растворов

7.3.1.Используется взвесь клеток инфузорий, полученная путем выращивания тест-объекта в определенных условиях (см. приложение Б), отмытая от продуктов метаболизма и корма (см. приложение В) и доведенная до рабочей концентрации (плотности) (1000 ± 500) кл/$см^3$.

7.3.2.Среда для культивирования и разбавления - среда Лозина-Лозинского (в дальнейшем Л-Л) готовится на дистиллированной воде. Возможно использование водопроводной воды, которая должна быть соответствующим образом обработана (дехлорирована отстаиванием в течении 5-10 суток), или иной заведомо нетоксичной воды (но не дистиллят!).

Для приготовления концентрата среды Л-Л в1$дм^3$ воды растворяют следующие соли: NaCl — 1,0 г, KCl — 0,1г, $MgSO_4$ — 0,1 г, $CaCl_2$— 0,1 г, $NaHCO_3$ — 0,2 г. Такой раствор можно хранить в холодильнике до 7 суток при температуре (8 ± 4)°С. Для работы используется среда Л-Л, полученная десятикратным разбавлением водой исходного концентрата. Разбавленная среда Л-Л не хранится. Разбавляющая среда и среда для культивирования должны быть идентичны и обеспечивать выживаемость инфузории в течение 5 суток.

7.3.3. Модельный токсикант готовится на основе меди сернокислой. Навеску 5-водной сернокислой меди 10,0 мг растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 1 $дм^3$. Раствор хранится 7 дней. Рабочие концентрации меди сернокислой готовят в день проведения анализа разбавлением концентрата, причем растворы с концентрациями до 1 $мг/дм^3$ готовят разбавлением дистиллированной водой, а с концентрациями 0,1 $мг/дм^3$ и меньше — средой Л-Л.

7.3.4 5%-ный раствор ПВС в среде Л-Л используют в качестве нейтрального загустителя. Для приготовления раствора ПВС 0,5 г порошка ПВС смешивают с 9,5 $см^3$ среды Л-Л. Смесь нагревают на водяной бане при температуре (85 ± 5)°С до растворения порошка. Используют раствор в течение суток.

7.4. При проведении биотестирования температура исследуемой пробы должна соответствовать температуре взвеси тест-объекта.

Инфузории не переносят резких перепадов температуры!

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Заполнение кювет

При определении токсичности и в контрольных и в анализируемых пробах используются кюветы строго одного типа: 2Т3.993.065 (13х13х45 мм) или 2Т3.993.066 (12,5х12,5х45 мм).

В кювету вносят 2,0 $см^3$ взвеси инфузорий в рабочей концентрации, предварительно проверенной по двум параметрам: по чувствительности к модельному токсиканту (см. приложение В п. 3.2) и по характеру выхода в разбавляющую среду. К взвеси добавляют 0,35 $см^3$ 5%-ного раствора ПВС, все тщательно перемешивают, непременно увлажнив стенки кюветы, и наслаивают пипеткой 1,6 $см^3$ анализируемой жидкости, не допуская перемешивания с нижним слоем

При большом количестве примесей и, следовательно, высокой плотности пробы, наслоение может оказаться невозможным. В таком случае исходную пробу следует разбавить средой Л-Л, полученное затем значение индекса токсичности скорректировать в соответствии со степенью разбавления.

Важно: не допустить увлажнения пробой верхнего торца кюветы. Рекомендуется по заполнении кюветы подсушить ее верх, например, фильтровальной бумагой.

Через 30 мин (продолжительность тест-реакции) последовательно производят определение концентрации инфузорий в верхней зоне кюветы в контрольных (Iк) и анализируемых (Ia) пробах. В качестве контрольных проб используется среда Л-Л. Контрольные и анализируемые пробы готовят одновременно.

8.2. Измерение концентрации инфузорий на приборе «БИОТЕСТЕР-2м»

Прибор «Биотестер-2м» должен пройти Государственную поверку.

Контроль работоспособности прибора осуществляется при каждом определении токсичности в режиме ТЕСТ.

Контроль свойств культуры инфузорий на соответствие требованиям раздела 2 производится при ее подготовке к измерениям (приложение В).

Подготовленные по п.8.1 кюветы последовательно помещают в кюветный модуль и снимают показания прибора.

В приборе "БИОТЕСТЕР-2м" предусмотрено три режима работы:

— измерение и индикация результата через каждые 34 с;

— измерение и индикация среднего значения результатов пяти отсчетов;

— измерение и индикация среднего значения результатов десяти отсчетов.

Работа с прибором:

а) установить режим усреднения "1" (горит индикатор над кнопкой, соседние индикаторы погашены);

б) вставить кювету в кюветную нишу, закрыть крышку, нажать кнопку "ПУСК";

в) индикация гаснет, на 14 с (время автоподстройки) загорается индикатор "ОТСЧЕТ", и еще через 20 с на индикационном табло появляется первое значение концентрации в условных единицах. Выдача отсчета сопровождается световым и звуковым сигналом продолжительностью 2 с;

г) в течение 24 с значение предыдущего отсчета сохраняется.

Очередные отсчеты появляются с тем же интервалом.

Если концентрация токсикантов настолько велика, что инфузории практически не выходят в пробу (показания прибора в условных единицах находятся в пределах 0,00-0,08), то начинает мигать индикатор "ТРЕВОГА". Это означает, что испытуемую пробу необходимо разбавить до получения на приборе значимых величин.

Такая же ситуация возникает из-за высокой окрашенности или мутности пробы, что может быть причиной слишком малой светопроницаемости, т.к. приборы серии Биотестер рассчитаны на пробы с коэффициентом пропускания не ниже 40% (см. Руководство по эксплуатации). Для уменьшения указанного влияния исходная проба может быть профильтрована через бумажный фильтр (белая лента). Если этого недостаточно, то пробу следует разбавить средой Л-Л и полученное значение индекса токсичности скорректировать в соответствии со степенью разбавления.

Последовательность операций при использовании других режимов измерений идентична вышеописанной. Контрольные и анализируемые

пробы делают в трех повторностях и по усредненным результатам рассчитывают индекс токсичности по п.9.1.

9. ОБРАБОТКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1.Оценку токсичности пробы производят по относительной разнице количества клеток в верхних зонах кювет в контрольной и анализируемой пробе.

Индекс токсичности определяется как:

$$T = \frac{|I_{ср.к} - I_{ср.а}|}{I_{ср.к}} К,$$

где Iср.к, Iср.а — средние показания прибора для контрольных и анализируемых проб соответственно, К – коэффициент разбавления пробы (см. пп. 8.1, 8.2, 9.3).

9.2. По величине индекса анализируемые пробы классифицируются по степени их токсичности на 3группы:

I. допустимая степень токсичности ($0,00 < T \leq 0,40$);

II. умеренная степень токсичности ($0,40 < T \leq 0,70$);

III. высокая степень токсичности ($T > 0,70$).

9.3. В случае очень токсичных проб, когда Т принимает значение 1 (т.е. когда в верхней зоне кюветы с анализируемой пробой подвижные инфузории не обнаруживаются), индекс токсичности не может однозначно характеризовать истинный уровень токсичности пробы. Пробу следует разбавить до такой степени, чтобы значение индекса токсичности не достигало 1, и полученное значение Т умножить на коэффициент разбавления. Степень разбавления пробы до уровня нетоксичности, например, при определении класса опасности, оценивается по выполнению условия: $T \leq 0,40$.

9.4. Некоторые пробы могут содержать безопасные, но привлекательные для инфузорий вещества. В таких случаях значения Iср.а. может даже несколько превышать Iср.к. Полученные при формальном расчете отрицательные значения индекса токсичности Т свидетельствуют об отсутствии токсичности и могут быть оценены как нулевые при условии выполнения нормативов приемлемости результата.

10. ОЦЕНКА ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1.Оперативный контроль сходимости проводится при анализе каждой рабочей пробы.

Сходимость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, если выполняется следующее условие:

$$|T - T_{max\ .min}| \leq r,$$

где r — норматив оперативного контроля сходимости (r = 0,43 T);

T_{max} — максимальное значение индекса токсичности пробы трех параллельных определений;

T_{min} — минимальное значение индекса токсичности пробы трех параллельных определений.

10.2. При превышении предела повторяемости (r) необходимо дополнительно получить еще три результата параллельных определения этой же пробы. Если при этом значение показателя повторяемости равно или меньше значения критической разности $CR_{0,95}$ (6), то в качестве окончательного результата токсикологического анализа принимают среднее арифметическое значение шести результатов параллельных определений. Значение критической разности $CR_{0,95}$ (6) для шести результатов параллельных определений приведены в табл. 2. Если значение критической разности $CR_{0,95}$ (6) превышает, то в качестве окончательного результата токсикологического анализа может быть принята медиана шести результатов определений.

10.3.При превышении норматива оперативного контроля сходимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их. Проводят дополнительную проверку чувствительности инфузорий к модельному токсиканту.

10.4. Для исключения грубых ошибок рекомендуется оперативно оценивать приемлемость «контроля» по условию

$$| I_{max} - I_{min} | \leq 0,2\ I_{ср.к.}$$

11. ФОРМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТА АНАЛИЗА

Результат токсикологического анализа в документах, предусматривающих его использование оформляется в виде протокола. Допускается форма протокола, принятая в конкретной лаборатории, адаптированная к данной методике. В протоколе обязательно указываются показания прибора как для контрольных, так и для исследуемых проб, и соответствующие средние значения, промежуточные и итоговое значения индекса токсичности.

Рекомендуемая форма протокола приведена в Приложении Г.

Примечание При представлении результата токсикологического анализа в документах, выдаваемых лабораторией, указывают:

— количество результатов параллельных определений, использованных для расчета результата токсикологического анализа;

— способ определения результата токсикологического анализа (среднее арифметическое значение или медиана параллельных определений).

ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-ОБЪЕКТА

А.1. В качестве тест-объекта используется *Paramecium caudatum* — инфузория-туфелька. Относится к подцарству простейших (одноклеточных животных) — *Protozoa*, типу — *Ciliophora*. Инфузория туфелька широко распространена в пресных водоемах. Форма клетки эллипсоидная, размеры — 200×40 мкм. Основную пищу инфузории составляют бактерии, дрожжи и т.п. Размножение инфузории происходит путем поперечного деления клетки. В зависимости от условий выращивания время генерации может составлять от нескольких часов до нескольких суток.

По сравнению с другими группами простейших инфузории имеют наиболее сложное строение и отличаются разнообразием функций. Инфузория находится в непрерывном движении. Скорость ее при комнатной температуре — 2,0-2,5 мм/с. Траектория движения сложная: она движется вперед, вращаясь вдоль продольной оси тела с помощью ресничек, количество которых достигает 10-15 тысяч. Изменение внешних условий (температура, химический состав среды и другие факторы) воспринимаются клеткой, и первая ответная реакция - изменение характера движения: уменьшение или увеличение скорости, частоты остановок и разворотов, разнообразные таксисы, например, гео-, магнито-, аэро-, хемотаксис.

А.2. Исходный материал для выращивания культуры инфузории передается при поставке прибора "БИОТЕСТЕР" и в дальнейшем по потребности пользователей. Поддержание культуры инфузории-туфельки в лабораториях при условиях, указанных в настоящей методике, не имеет временных ограничений. Культуру можно также получить из коллекций культуры простейших, имеющихся в различных научных организациях (например, в БиНИИ СПб ГУ:198904, Старый Петергоф, Ораниенбаумское шоссе, 2).

ВЫРАЩИВАНИЕ КУЛЬТУРЫ

Б.1. Общие положения.

В данной методике может быть использована культура инфузории, выращенная по различным методикам, которые обеспечивают получение тест-объекта, во-первых, в достаточном для анализов количестве, во-вторых, чувствительного к модельному токсиканту в пределах концентраций, установленных в п. В 3.2.

Выращивание культуры проводят в любых удобных сосудах, например, в стеклянных колбах, стаканах, чашках Петри и других.

В качестве корма используют бактерии, дрожжи и их смесь, выращенные стерильно на твердых средах. При отсутствии условий для выращивания стерильного корма, можно использовать воздушно-сухие пекарские дрожжи.

К общим положениям по выращиванию культуры относится обязательное требование идентичности среды выращивания и среды, которая будет использована для процедур отмывания культуры от продуктов метаболизма, получения рабочей взвеси, разведения водных проб и прочих процедур с культурой.

Б.2. Метод культивирования инфузории.

В широкогорлую коническую колбу на 200 $см^3$ вносят суспензию инфузорий в среде Лозина-Лозинского в количестве 100 $см^3$ с плотностью (1000±200) кл/$см^3$. В качестве корма добавляют воздушносухие дрожжи из расчета 1 мг на 1$см^3$ среды. Выращивание ведут при температуре (20 ± 5) °С.

Для биотестового анализа используют культуру в начале стационарной фазы роста. Для контроля за развитием популяции отбирают ежесуточно пробу, в которой определяют количество клеток по п. Б.4.1. Отсутствие прироста клеток в популяции свидетельствует о наступлении стационарной фазы роста, ежесуточный контроль позволяет определить ее начало. Обычно при заданных в начале раздела Б.2. условиях стационарная фаза роста наступает на 2-3 сутки, при этом плотность культуры будет составлять (4000 ± 1000) кл/$см^3$.

Б.3. Поддержание и хранение культуры.

При перерывах в проведении биотестовых анализов культуру достаточно поддерживать только как посевной материал. Один из способов поддержания — на зернах риса. В чашку Петри помещают 2-3 сырых зернышка риса, добавляют среду Л-Л 30-40 $см^3$ и помещают клетки инфузории в количестве 50-100 клеток /$см^3$. Раз в 2 недели меняют среду и зерна риса.

Другой способ консервации культуры — хранение в холодильнике при температуре (8±4) °С. Скорость деления при этом может составлять одно

деление в 10-20 суток. Культуру отмывают от продуктов метаболизма и старого корма, доводят концентрацию взвеси до 200-300 кл/см^3, добавляют сухие дрожжи в количестве 0,2 мг на 1 см^3 и помещают в холодильник. Так культура сохраняется до месяца. При использовании культуры, хранившейся в холодильнике, необходимо по извлечении из холодильника дождаться выравнивания ее температуры с температурой в лаборатории с разницей не более 2 °С, например, пассивным образом (5-7 ч выдержки на лабораторном столе), и только после этого производить необходимые процедуры.

Особое внимание следует обратить на то, что инфузория не выдерживает резких перепадов температуры !

Б.4. Определение концентрации взвеси инфузорий.

Концентрацию клеток необходимо контролировать в процессе выращивания культуры, при подготовке рабочей взвеси клеток и для определения величины тест-реакции. Определение концентрации клеток инфузорий без затруднений выполняется с помощью отградуированного прибора серии "Биотестер".

Б.4.1. Концентрацию клеток инфузории определяют подсчетом клеток под микроскопом по общепринятым в микробиологической практике методикам: с помощью измерительных сеток, счетных камер и т.п. Подсчитанное количество клеток пересчитывают на единицу объема среды и выражают как концентрацию (кл/см^3). Ниже приводится пример способа подсчета клеток инфузорий. Исходную взвесь инфузорий взболтать, отобрать с помощью пипетки 0,5 см^3 взвеси. К этому объему добавить 4,5 см^3 1%-ного раствора NaCl. Таким путем достигается обездвиживание инфузорий. Не дожидаясь полного обездвиживания инфузорий (примерно через 2-5 мин) из разбавленной взвеси отбирают 0,5-1,0 см^3 и распределяют этот объем в виде 6-10 крупных капель на сухом стекле (например, в чашке Петри). С помощью микроскопа (лупы) подсчитывают инфузории во всех каплях. Полученный результат пересчитывают на 1 см^3 исходной взвеси.

Например: 0,5 см^3 взвеси обездвиженных инфузорий распределены в 6 каплях, в которых было сосчитано 29, 38, 32, 31, 28, 35 клеток — всего 193. В 1 см^3 разбавленной взвеси содержится 386 клеток, а в 1 см^3 исходной взвеси, следовательно, будет содержаться 3860 клеток инфузорий.

Б.4.2. Специализированным средством для определения количества подвижных клеток инфузории является прибор серии "Биотестер". Определение концентрации подвижных клеток проводят по предварительно построенной градуировочной кривой.

Для построения градуировочной кривой берут взвесь клеток инфузории в среде Л-Л по п. В.2. Из взвеси готовят ряд разбавлений, каждое из

которых по концентрации меньше предыдущего в 2 раза, объем взвеси каждого разбавления не менее 5 $см^3$. Последнее разбавление может содержать 5-10 $кл/см^3$. Исходную концентрацию клеток определяют подсчетом числа клеток под микроскопом (см. п. Б.4.1.) Концентрации клеток в серии разбавлений определяют соответствующим расчетом. При этом последовательно определяют концентрацию подвижных клеток инфузорий, находящихся в исходной рабочей взвеси и во всех разбавлениях, снимая показания на приборе. Для этого заполняют кювету контролируемой взвесью клеток до верха (инфузории не обездвиживать!), помещают в кюветный модуль прибора и снимают ряд показаний.

Процедуру подсчета клеток в исходной взвеси, приготовление разбавлений, измерение на приборе исходной взвеси и разбавлений повторяют не менее 3 раз и результаты усредняют. По полученным данным строят градуировочную кривую как зависимость показаний прибора от логарифма концентрации клеток. Построенная кривая может быть использована для одного и того же измерительного прибора до его ремонта или перенастройки.

ПРИЛОЖЕНИЕ В (обязательное)

ПОДГОТОВКА ИНФУЗОРИЙ К АНАЛИЗУ

В.1.Выращенную культуру инфузории отмывают от продуктов метаболизма и корма, доводят концентрацию до рабочего значения, проводят проверку готовности культуры к анализу по ее чувствительности к модельному токсиканту и по ее способности выходить в чистую пробу.

В.2.Отмывание культуры.

При отмывании используют нормальную физиологическую реакцию инфузорий собираться в верхних слоях жидкости. Использование сосудов с узким длинным горлом позволяет сконцентрировать инфузории в верхней зоне и слить их в другой сосуд с минимальным количеством загрязненной культуральной среды. Концентрат разбавляют чистой средой Л-Л, опять собирают клетки в верхней зоне и сливают. В результате отмывания инфузорий степень разбавления культуральной жидкости чистой средой должна быть не менее 1:200.

Пример. Культура выращена на среде Л-Л. Отмывочная среда — Л-Л. К 50 $см^3$ культуры в широкогорлой конической колбе на 250 $см^3$ добавляют около 60 $см^3$ среды Л-Л, тщательно перемешивают, переливают в мерную колбу на 100 $см^3$, обязательно заполняя горлышко. Через 5-15 минут инфузории собираются в верхней зоне. Сливают верхнюю часть жидкости из колбы. Получают взвесь клеток с разбавлением культуральной жидкости примерно в 2 раза и объемом, например, 20 $см^3$. Процедуру по отмыванию повторяют еще 2 раза, добавляя к 20 $см^3$ взвеси 80 $см^3$ среды

Л-Л, и получают взвесь клеток, например, в объеме 10 $см^3$ с разбавлением исходной взвеси инфузорий в 50 раз. Доводят объем полученной взвеси 10 $см^3$ до 50 $см^3$ и получают разведение в 250 раз. Определяют концентрацию клеток в полученной взвеси по п. Б.4.1 и доводят ее до значения (1000±500)кл/$см^3$. Полученную рабочую взвесь клеток инфузорий после предварительной проверки используют в течение 1,5 часов.

Для прибора Биотестер-2м диапазон рабочих концентраций соответствует показаниям прибора примерно от 100 до 300 ед.

В.3. Проверка готовности взвеси инфузорий к анализу.

Проверку проводят по двум параметрам одновременно:

— по степени выхода инфузорий в контрольную чистую пробу:

— по чувствительности к модельному токсиканту.

В.3.1. Для проверки выхода инфузорий в контрольную пробу заполняют по п.8.1 три кюветы взвесью клеток, наслаивают среду Л-Л или заведомо нетоксичную воду (**но не дистиллят!**). Через 30 минут измеряют концентрацию клеток в верхних зонах кювет по п.8.2. Усредняют результат по 3 кюветам и определяют готовность тест-культуры к биотестовому анализу по условию: выход должен быть не менее 70% от концентрации рабочей взвеси.

В.3.2. Для проверки чувствительности инфузорий к модельному токсиканту заполняют по п.8.1 три кюветы взвесью клеток, наслаивают раствор сульфата меди с концентрацией 0,1 мг/$дм^3$, приготовленный по п.7.3 методики. Через 30 минут измеряют концентрацию в верхних зонах кювет по п.8.2 и рассчитывают индекс токсичности к раствору сульфата меди.

При $0,2 < T < 0,7$ культуру используют в биотестовом анализе.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное)

ФОРМА ПРОТОКОЛА БИОТЕСТИРОВАНИЯ

_____

(название Министерства, ведомства, если необходимо)

_____

(название организации, структурным подразделением которой является лаборатория, если необходимо)

_____

(название лаборатории, аттестованной на право проведения измерений; аттестат аккредитации №_____ от ____)

_____

(адрес лаборатории, телефон, факс)

Протокол №__ от_____

Наименование объекта _____

Биотестируемая среда_____

Условия отбора и транспортировки проб

_____

Дата доставки проб _____

Используемая МИ _____

№ п. п	Тип измерения		Показания прибора, I, у.е.	Среднее значение показаний	Индекс токсичности T, у.е.	Среднее значение Tср	Комментарий
1	Контрольная среда Л-Л	1	114 117 120	114			
		2	129 120 117				
		3	106 104 99				
2	Проба 1	1	83 89 81	84	0.26	0.29	
		2	82 75 86	81	0.29		
		3	74 83 80	79	0.31		
3	Проба 2	1	25 22 19	22	0.80	0.81	
		2	20 21 17	19	0.83		
		3	25 23 20	23	0.80		

Биотестирование выполнил(а) (подпись) (расшифровка подписи)

Заведующий лабораторией (подпись) (расшифровка подписи)

001941

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ
(Ростандарт)
Федеральное государственное унитарное предприятие
«Уральский научно-исследовательский институт метрологии»
(ФГУП «УНИИМ»)
Государственный научный метрологический институт

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики (метода) измерений

№ 222.0326/01.00258/2014

Методика измерений индекса токсичности проб почв, донных отложений и осадков
наименование методики, включая наименование измеряемой величины, и, при необходимости,
сточных вод с применением приборов серии "Биотестер",
объекта измерений, дополнительных параметров и реализуемый способ измерений

предназначенная для использования в экоаналитических лабораториях с целью
область использования
государственного экологического контроля и мониторинга,

разработанная ООО "СПЕКТР-М" (191167, г. С-Петербург, а/я 86)
наименование и адрес организации (предприятия), разработавшей методику

и содержащаяся в документе организации "Методика определения токсичности проб
обозначение и наименование документа, содержащего методику, год утверждения, число страниц
почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением

прибора серии "Биотестер", год утверждения -2014, на 15 стр.

Методика аттестована в соответствии с ФЗ № 102 "Об обеспечении единства измерений" и ГОСТ Р 8.563-2009.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по
теоретических и (или) экспериментальных исследований
разработке методики измерений и экспериментальных исследований

В результате аттестации методики измерений установлено, что методика измерений
нормативно-правовой документ в области обеспечения единства измерений (при наличии) и ГОСТ Р 8.563
соответствует требованиям, предъявляемым ГОСТ Р 8.563-2009

Показатели точности измерений приведены в приложении на 1 л.

Директор **С.В. Медведевских**

Зав. лабораторией **О.Б. Пономарева**

Дата выдачи «15» 12 2014

Рекомендуемый срок пересмотра методики измерений: 15.02.2020

М.П.

Россия, 620000, г. Екатеринбург, ул. Красноармейская, 4
Тел.: (343) 350-26-18, факс: (343) 350-20-39, E-mail: uniim@uniim.ru

Приложение к свидетельству № 222.0326/01.00258/2014
об аттестации методики измерений индекса токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод с применением приборов серии «Биотестер»

1 Значения показателей повторяемости, воспроизводимости и точности

Наименование объекта	Показатель повторяемости (среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r	Показатель воспроизводимости*) (среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R	Показатель точности (границы абсолютной погрешности при доверительной вероятности P=0,95), δ
Почва, донные отложения и осадки сточных вод	0,13 Т	0,30 Т	0,60 Т

*) Значение показателя воспроизводимости установлено на основе межлабораторного эксперимента в 3-х лабораториях.

Т – результат измерения токсичности пробы в условных единицах (индекс токсичности)

2 Значения предела повторяемости, воспроизводимости, критической разности при доверительной вероятности P=0,95

Наименование объекта	Предел повторяемости (допускаемые расхождения для трех результатов параллельных определений), r	Критическая разность (допускаемые расхождения для шести результатов параллельных определений), $CR_{0,95}(6)$	Предел воспроизводимости (допускаемые расхождения для двух результатов измерений, полученных в разных лабораториях), R
Почва, донные отложения и осадки сточных вод	0,43 Т	0,52 Т	0,83 Т

Вед. инженер ФГУП «УНИИМ»,
эксперт-метролог
(сертификат RUM 02.33.00219-2) Белобородова Г.И.

Дата выдачи 15 декабря 2014 г.

gost.e-ecolog.ru